

## RÉSZLETES JELENTÉS

### 1. alprojekt - *Tortula ruralis* mohagyepék genetikai diverzitása

#### Bevezetés

Az alprojekt a *Tortula ruralis* mohafaj gyepeinek genetikai struktúráját kívánta feltárni. A faj kiterjedt, extenzív gyepeket alkot nyílt homokpusztagyepekben, amely gyepek genetikai összetételéről azonban semmilyen információval nem rendelkezünk, így nem világos az sem, hogy egy-egy összefüggő gyeep egy, vagy több genetikai egyedből áll-e. Továbbá az sem ismert, hogy az egyes homokpusztagyepi fragmentumok *Tortula* állományai mennyire különböznek egymástól, azaz milyen mértékű a gyepek közti génáramlás. Habár a mohák jellemzően képesek kisebb, letöredezett hajtásfragmentumokból új egyedeket létrehozni, ezek feltehetően rövidebb távú diszperziót biztosítanak, mint a szexuális szaporodás során keletkezett spórák. Ezért arra is kíváncsiak voltunk, hogy az egyes gyepeken belül a szexuális vagy az aszexuális folyamatok dominálnak-e. Ezen kérdések megválaszolásához genetikai markereket alkalmaztunk.

#### Mintavétel

A mintavételhez két homokpusztagyep állományt választottunk ki Fülöpháza (N 46°52'42", E 19°24'02") és Bugac (N 46°39'12", E 19°37'02") közelében. A mohapárnák nagyobb kiterjedése miatt Bugac mellett két homokpusztagyepben, míg Fülöpházán egy homokpusztagyepi állományban vettünk mintát. Mivel előzetes vizsgálataink megmutatták, hogy a néhány centiméterre elhelyezkedő egyedek a legtöbb esetben ugyanazon genetikai egyedhez tartoztak, a következő mintavételi stratégiát követtük. Minden állományban két darab, egyenként 5x5 méteres háló metszéspontjaiból vettünk mintát (36 minta hálónként). A két mintavételi egységet az adott állomány két eltérő mikroklimájú pontján helyeztük el (buckaköz és buckatető). Összesen 216 minta begyűjtésére és elemzésére került sor.

A többi részprogramban vizsgált mohafajokkal ellentétben a DNS izolálása és a PCR reakciók optimalizálása komoly problémát okozott a *Tortula ruralis* esetében. Végül négy ISSR primert választottunk ki és a további genetikai analízisben ezeket használtuk.

A *Tortula ruralis* gyepeinek genetikai struktúrájáról - viszonylagos nehézségek árán – kapott információk részben nem támasztották alá hipotéziseinket, részben pedig az ismétlések miatt a kutatásra szánt idő- és erőforrásokat is aránytalanul lekötötték. Ennek megfelelően egyes betervezett vizsgálatokhoz időben nem állt rendelkezésre annyi információ, hogy még a kutatási periódus lejárta előtt reális mintavétellel el tudtuk volna kezdeni. Ezek megvalósítása tehát későbbi időszakra tolódott ki.

#### Eredmények

##### Mintavételi helyszínek közti különbségek

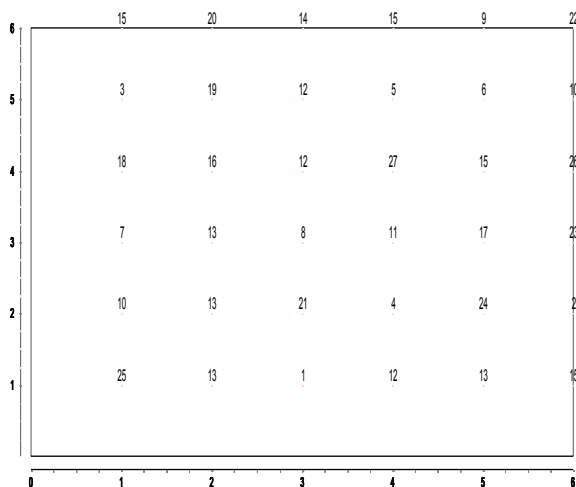
Elsőként az egyes állományokban található *Tortula* gyepek genetikai összetételét vetettük össze egymással. Ennek leírására a legalkalmasabb a molekuláris variancia

analízis (AMOVA). Ennek segítségével leírható a genetikai variancia megoszlása a különböző egységek szintjén. A vizsgálathoz nested AMOVA analízist használtunk ahol az egyes mintavételi egységek az állományok alegységeiként jelentek meg. Ezzel a vizsgálattal arra próbáltunk fényt deríteni, hogy mekkora az egyes állományok genetikai izoláltsága. Az egységek genetikai differenciációját az  $F_{st}$  értékekkel írtuk le.

Az egyes állományok genetikailag nem különböztek egymástól szignifikánsan amit az állományok között kapott igen alacsony  $F_{st}$  érték ( $F_{st}$  állományok között = 0.0245) illetve az, hogy ez az érték nem tért el szignifikánsan a nulla differenciációtól ( $F_{st}$  95% bootstrap konfidencia intervallum = -0.0083 - 0.0604), is jól mutat. Ezt a megfigyelést a molekuláris variancia megoszlása is alátámasztotta: a variancia csupán 4% volt megtalálható az állományok között, míg a maradék (96%) az egyes állományokon belül mutatkozott. Ezzel szemben az állományokon belüli egyes mintavételi egységek erőteljesebb és statisztikailag szignifikáns genetikai differenciálódást mutattak ( $F_{st}$ = 0.0435; 95% bootstrap konfidencia intervallum= 0.0126 - 0.0910). Mindez arra mutat, hogy az egyes állományok között jelentős a génáramlás. A génáramlás mértéke akkora, hogy a genetikai sodródás a populációkat egymástól elválasztó hatását ellensúlyozni képes. A mintavételi egységek közötti szignifikáns genetikai különbségek azonban arra utalnak, hogy az egymáshoz térbelileg közelebb elhelyezkedő egyedek genetikailag jobban hasonlítanak egymásra, mint ahogyan azt egy random referencia alapján várnánk. Ez a látszólag ellentmondásos eredmény a következő módon magyarázható meg. Az egyes állományok között jelentős spóratranszport játszódik le a kolonizálás folyamata során. A kolonizáció azonban feltételezhetően csak néhány spóra segítségével történik. Ebből adódóan az egyes kolóniák néhány spóra leszármazottjai, viszont az egyes mintavételi egységek különböző geográfiai régiókból érkezett, egymástól jelentősen eltérő genotípusokat reprezentálnak. Azaz, egy állomány egy nagyobb skálán egy genetikai mozaikot alkot, ahol az egyes szubpopulációk egymástól jelentősen különbözhetnek. A finom léptékben végzett vizsgálatainkról a következő fejezet ad beható információt.

### Finomléptékű genetikai struktúra

A finomléptékű genetikai struktúra feltárása során egyértelművé vált, hogy a



*Tortula ruralis* egybefüggőnek és klonálisnak tartott gyepei genetikailag közel sem egyöntetűek. A 36 egyed tartalmazó mintavételi egységek szinte minden egyede eltérő genetikai egyednek bizonyult. A négy bugaci mintavételi egységben rendre 23,24,27 és 27 genetikai egyed találtunk míg a fülöpházi mintaterület két egysége 24 és 21 genetikai egyed tartalmazott. A genotipikus diverzitás (Simpson index) 0.97 és 0.98 között mozgott a vizsgált mintavételi egységekben, ami szintén egyértelműen tükrözi a genotipikus sokféleséget. Mindez azt sugallja, hogy a

klonális növekedés vagy szaporodás szerepe relatíve kicsi a *Tortula ruralis* magyarországi populációiban, legalábbis az adott térbeli skálán. Hasonlóan jól szemléltetik ezt az alábbi képek, ahol az egyes genetikai klónokat eltérő számok jelölik.

Ahhoz, hogy a genetikai sokféleség térbeli eloszlásáról képet kapjunk, megvizsgáltuk az egyedek közötti térbeli távolság és genetikai rokonság közötti összefüggést. Egy ideális populációban, ahol a terjedés limitált, a térben távolabbi egyedek várhatóan genetikailag is jelentősebben különböznek. A hat mintavételi egységből csupán kettőben találtunk szignifikáns negatív összefüggést a térbeli és a genetikai távolságok között. Azaz a teljes mintavételi terület skáláján csak néhány esetben mutatható ki térbeli genetikai struktúráldás. Ha azonban a térbeli távolságokat osztályokba soroljuk, akkor csupán egy mintavételi egység nem mutatott szignifikáns genetikai struktúrát. Ezek az eredmények egyértelműen rámutatnak arra, hogy kis térléptékben kimutatható genetikai struktúra, azaz a térbeli közelség a genetikai rokonságban is megmutatkozik.

Annak eldöntéséhez, hogy ez az összefüggés klonális növekedés majd azt követő mutáció vagy pedig szexuális szaporodás következménye-e, kapcsoltsági egyensúly vizsgálatot végeztünk. Egy klonálisan növekedő populációban, ahol egy mutáció egy adott helyen csak egyszer jelenik meg, erős kapcsoltság várható az egyes markerek között. Ezzel szemben egy szexuális populációban a folytonos rekombináció a markereket függetlenné teszi egymástól azaz kapcsoltsági egyensúlyba kerülnek. Ennek tesztelésére a markerek kapcsoltságának mértékét hasonlítottuk össze egy random referenciával ahol a markerek szabad kombinációját engedték meg. A hat mintavételi egység közül csupán kettőben tapasztaltunk a markerek szabad kombinációjától szignifikánsan nem különböző kapcsoltsági értékeket, míg a mintavételi egységek többségében a kapcsoltság mértéke szignifikánsan meghaladta a random referenciát.

### **Jelentőség**

Vizsgálatunk több váratlan eredményre vezetett. Először megmutattuk, hogy az egymástól több tíz kilométerre fekvő *Tortula ruralis* homokgyepi populációi genetikailag szignifikánsan nem különböznek. Ez egyértelműen mutatja, hogy a faj spórái messze terjedhetnek és a génáramlás mértéke akkora, hogy a genetikai sodródás által előidézett divergenciát teljesen képes ellensúlyozni.

Ha azonban az egyes állományokon belüli foltokat hasonlítottuk össze egymással, azok genetikai differenciációja meghaladta a random referenciáét. Ez arra utal, hogy a homokpusztagyep állományok között, illetve azokon belül eltérő folyamatok dominálnak. Az egyes állományok foltjainak genetikai divergenciáját alapvetően a foltok szintjén lejátszódó dinamika határozza meg. Ahogy kimutattuk, a foltok első ránézésre viszonylag kevés genetikai klónt tartalmaznak, mégis többségük genetikai struktúrája nem felel meg egy csak szexuális szaporodást mutató referenciának. Azaz a genetikai struktúra kis térléptékben ugyan, de jelen van, ami feltehetően abból ered, hogy a spórák nagy hányada az anyanövényhez közel ér földet. A térbeli struktúra kialakulásához természetesen a klonális növekedés is hozzájárul.

Habár az egyes mintavételi egységek skáláján az egyedek szignifikánsan különböztek egy állandóan szexuálisan szaporodó referencia populációtól ez az eltérés relatíve gyenge volt. Ez arra utal, hogy a populációk szexuálisan is szaporodnak és egy párna nem feleltethető meg egyetlen genetikai klónnak, ami szöges ellentétben áll azzal a

korábbi elképzeléssel, hogy a félsivatagi körülmények által kiváltott stressz a klonális növekedést részesíti előnyben számos mohafaj esetében. Ez, a feltételezések szerint, a mohák vízhez kötött szaporodásának és a fejlődő ivarszervek gyenge kiszáradástűrésének közvetlen következménye. Ezért vizsgálataink egyértelműen rámutatnak arra, hogy a *Tortula ruralis* generatív képletei jelentős kiszáradástűréssel rendelkezhetnek.

## **2. alprojekt - A szubsztrát hatása a *Hypnum cupressiforme* epifiton mohafaj reprodukív sajátosságaira (ökológiai megfigyelések és RAPD markerek alapján)**

### **Bevezetés és kérdések**

Ebben a részprojektben az élő és kidőlt, korhadó fán előforduló mohapopulációk genetikai és reprodukív vizsgálatát tűztük ki célul. Előzetes vizsgálatok ugyanis azt sugallták, hogy a szubsztrát jelentős hatással lehet a mohafajok populációinak genetikai struktúrájára illetve reprodukív és vegetatív életfolyamataira. Ez a megfigyelés különösen igaz az elkülönült hím és női gametofitonnal rendelkező fajokra, amelyek esetében a nemek eltérő szubsztrátpreferenciával rendelkezhetnek. A vizsgálatokhoz elővizsgáltuk alapján a *Hypnum cupressiforme* lombosmohafajt választottunk ki modellként, amely faj mindkét szubsztráton (élő ill. holt fa) azonos gyakorisággal megtalálható és kétlaki gametofitonnal rendelkezik. A faj Európa mérsékelt övi részén általánosan elterjedt, így a vizsgálatok során kapott eredmények nem csupán egy adott fajra vonatkozó információt nyerünk. Továbbá a faj tökéletesen megfelel a követelményeknek, hiszen a vizsgálathoz megfelelő mérettel, növekedési ütemmel, tömegességgel és gyakorisággal rendelkezik. A vizsgálat során a következő kérdésekre kerestük a választ.

(i) Kérdés: Hatással van-e a szubsztrát a *Hypnum cupressiforme* reprodukív jellemzőire?

(ii) Kérdés: Hogyan befolyásolja a szubsztrát a *Hypnum cupressiforme* populációk genetikai struktúráját?

(iii) Kérdés: A *Hypnum cupressiforme* különböző nemű egyedei térben szeparáltak jelennek-e meg?

(iiii) Kérdés: Mekkora lehet egy hím és női egyed közti megtermékenyítési távolság?

### **Mintavétel**

A vizsgálat realizálása során több apró pontban eltértünk a benyújtott pályázatban leírtaktól. Mindez azonban nem meglepő, hiszen a vizsgálat mintavételi részének alkalmazkodnia kell a mindenkorai mintavételi terület adottságaihoz. Mint már a korábbi a részjelentésekben említettük, a *Hypnum cupressiforme* genetstruktúrája igen finom léptékben mozog, így a mintaelemszámot növeltük, míg a megvizsgált szubsztrátok számát csökkentettük. Ennek következtében egy mintaterület részletes populációstruktúrájának feltárására fektettük a hangsúlyt. A RAPD markerek közül mindösszesen 4 primer szolgáltatott megbízható eredményeket ezért ezeket alkalmaztuk a további vizsgálatok során (UBC 856, 857, 888, 889).

Három álló és három fekvő fa mohagyepje került megmintázásra. A gyepet egy 10 x 10 cm-es hálóval borítottuk le majd minden egység közepéből vettünk mintát. Összesen 900 egyed került begyűjtésre (egy szisztematikus rácshálót alkalmazva), amelyeknek nemét morfológiai vizsgálat során állapítottuk meg mindkét szubsztráttípuson.

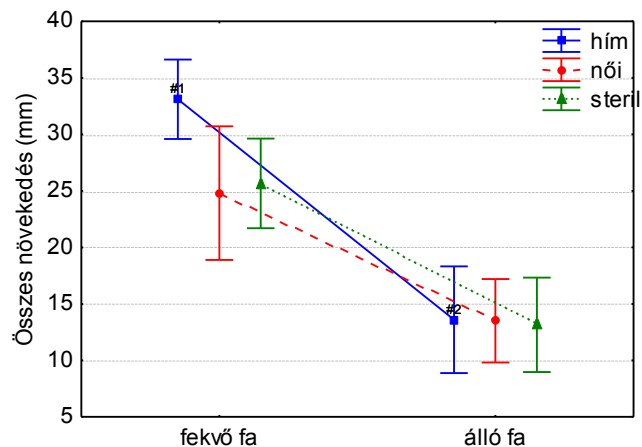
Ugyan az eredeti pályázatban nem szerepelt, mégis szükségesnek tartottuk, hogy az eltérő nemű hajtások reproduktív és generatív sajátosságairól részletes információt gyűjtsünk. Ehhez 4 álló és 4 kidőlt fán egyenként 40 egyedet (hím és női egyedek) jelöltünk meg cérna segítségével majd háromhavonta milliméterpapír segítségével rögzítettük a hajtások növekedését (főhajtás, oldalhajtás). A hajtásokat egy évig követtük nyomon. Ezen egyedek szolgáltatottak információt arról, hogy hogyan befolyásolja a szubsztrát generatív és vegetatív folyamatokat. Mindkét vizsgálatot a Börzsöny Hosszúpatak völgyében található mintaterületen folytattuk le.

### Eredmények összefoglalása és értékelése

Jól ismert jelenség, hogy a korhadó fa korhadási állapotának előrehaladtával egyre szivacsosabb struktúrát vesz fel, azaz vízmegtartó képessége növekszik. A mohák, mint poikilohidrikus növények primer produkciója illetve életfolyamatai nagymértékben függenek a rendelkezésre álló víz mennyiségétől. Emellett több vizsgálat is alátámasztja, hogy az ivarszervképzés mértéke is erőteljesen környezetfüggő. Hipotézisünk ezek alapján az volt, hogy a rosszabb vízellátottsággal jellemezhető élő fa kérgén az ivarexpresszió alacsonyabb lesz.

Eredményeink azonban ennek ellentmondanak, azaz mind a kidőlt és az élő fakérgen a rametek szinte azonos hányada (66 és 53%) képzett gametangiumot, ami statisztikailag nem volt szignifikáns ( $\chi^2_{df=1}=0,080$ ;  $p=0,3729$ ). Ezzel ellentétben a különböző nemű rametek aránya a két szubsztráton szignifikánsan különbözőnek bizonyult: a női rametek az élő fák kérgén domináltak, míg a hím rametek a kidőlt fatörzseken voltak jelen nagyobb arányban ( $\chi^2_{df=2}=29,12$ ;  $p<0,01$ ; lásd egyes ábra).

A vizsgálat hasonló eredményre vezetett akkor is, ha a genetikai információt is bevontuk az analízisbe, azaz a vizsgálatot a genetek szintjén végeztük el. A kidőlt fakérgen nem csak a hím egyedek száma volt nagyobb, hanem klónjaik átlagos kiterjedése is mintegy hétszer nagyobbak bizonyult, mint a nőké. Mindez arra mutat, hogy a különböző nemű spórák, egyelőre ismeretlen okok miatt, eltérő megtelepedési sikert mutatnak korhadó illetve élő fák kérgén. Az eltérő megtelepedési képességen kívül a hím klónok tapasztalt dominanciája a kidőlt fákra arra mutat, hogy a szubsztrát nem csak a megtelepedésre, hanem a nemek további növekedésre is jelentős hatással van.

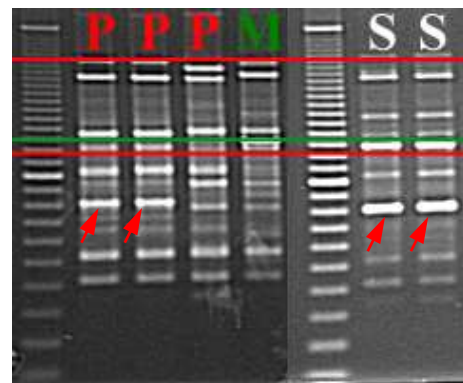


1. Ábra A hajtások össznövekedése az egyéves vizsgálat ideje alatt a két szubsztráton (átlag és 95% konfidencia intervallum).

A jelölt hajtások segítségével végzett vizsgálatok segítettek tisztázni a szubsztrát vegetatív folyamatokra kifejtett hatását. A földön fekvő fatörzseken a hím, női és steril hajtások egyaránt gyorsabban növekedtek a vizsgált időszak alatt, mint az álló fák kérgén mind a teljes növekedést, mind pedig az oldalhajtások számának növekedését és hossznövekedését tekintve (U-teszt,  $p < 0.05$  minden esetben, lásd az egyes ábrát). Ez arra utal, hogy a hossznövekedés az álló fák kérgén abiotikusan limitált. Mégis a nemek eltérő módon növekedtek a két szubsztráttípuson, eltérően reagáltak arra. A hímek szignifikánsan nagyobb növekedést mutattak a kidőlt fán mint a steril vagy női hajtások. Végül a kéthavonta végzett növekedés-detektálás felhívta a figyelmünket arra, hogy a nemek nem csak átlagos növekedési rátájukban térnek el egymástól, hanem a növekedés időbeli lefutása is különböző. A hím hajtások erőteljesebben növekednek ősszel, míg gyengébben növekednek tavasszal, mint a steril és női hajtások. Azaz a nemek növekedésének időbeli üteme eltér.

A szubsztrát egyértelműen hatással volt a genetikai struktúrára is. Hipotézisünk szerint a kidőlt fa – talán jobb vízellátottsága miatt – több spóra csírázását teszi lehetővé. Ennek megfelelően átlagosan kevesebb klón megjelenésével számoltunk az álló fákon. A genetikai vizsgálat egyértelműen megmutatta, hogy a kidőlt fák populációi genetikailag meglehetősen diverzek. Egy genetikai klón átlagos kiterjedése  $3.86 \text{ dm}^2$  ( $SE=1.56$ ) volt a korhadó fán, ezzel szemben az élő fák klónjai jelentősen nagyobbak voltak (átlag:  $6.34 \text{ dm}^2$ ,  $SE=1.23$ ). A klónok mindkét esetben összefonódva fordultak elő, mutatva, hogy a megtelepedést követően növekedésük a gerilla stratégiát követi. Összefoglalva, a genetikai elemzés támogatja azt a munkahipotézist, hogy az álló fákon a spórák megtelepedési esélye kisebb, ami a klónok alacsonyabb számában jelenik meg. Az a tény, hogy az álló fán a klónok mérete átlagosan nagyobb arra utal, hogy az álló fákon a vegetatív növekedés nagyobb szerephez jut, mint a kidőlt tuskókon.

Vizsgálatunk további kérdése volt a megtermékenyítési távolság megállapítása. Ennek megválaszolásához a sporofitonnal rendelkező női hajtásokat terveztük megvizsgálni. Az anyai és az apai allél egyértelmű meghatározásához a sporofiton genotípusából ki kell vonni az anyai genotípust, majd meg kell keresni a maradék alléleket (apai) hordozó hím gametofitonokat az anyanövény körül. Habár a gametofitonokból való DNS kivonása nem okozott problémát, a sporofitonokból több próbálkozást követően sem sikerült megfelelő mennyiségű és minőségű extraktumhoz jutni. Ez azt eredményezte, hogy a sporofitonoknak csak igen kis százaléka adott értékelhető eredményt, így a megtermékenyítési távolságok becsléséről le kellett tennünk. Ennek megfelelően – ahogy már korábban említettük – inkább a gametofiton populáció részletesebb genetikai struktúrájának feltárását végeztük el. Mindenesetre, egy közel sikeresnek mondható sporofiton-anyanövény-hím gametofiton összehasonlítás eredményét a 2. ábra szemlélteti.



2. Ábra Balra: három lehetséges hím gametofiton (P) és az anyanövény (M) profilja. Jobbra: az anyanövény két sporofitonjának profilja (S). A piros vonalak mutatják az apai, a zöld vonal az anyai alléleleket. A piros nyilak azt a markert

### **Jelentőség**

A vizsgálat során feltárt törvényszerűségek jelentős következményekkel járnak a ciprusmoha, és általában véve a kétlaki gametofitonokkal rendelkező mohafajok populációbiológiájára nézve. Jól tudott, hogy a virágos növényekkel ellentétben, ahol a fajok csupán mintegy 2%-a kétlaki, a lombosmohák több mint 60%-a különálló hím és női gametofitonnal rendelkezik. A kétlakiság elméleti megfontolások alapján egy evolúciósan stabil stratégia, és gyakran együtt jár a nemek specializációjával. Ez a folyamat az egyik nem kizáródásához és monodomináns állományok kialakulásához vezethet, ami jelentősen befolyásolhatja a populáció evolúciós potenciálját. A kétlaki lombosmohák többségében az ivarmeghatározás szexkromoszómákhoz kötött, ami a hím és női egyedek 1:1 arányát eredményezi. Mégis számos vizsgálat kimutatta, hogy a populációk gyakran egyenlőtlen ivararányúak, illetve néhány esetben szexuális dimorfizmus is megfigyelhető.

Vizsgálatunk egyértelműen megmutatta, hogy az ivararányok ferdültsége szubsztrátfüggő. Ezt egyrészt az eltérő nemű spórák differenciális csírázási képessége (hím illetve női gametofiton klónok számának eltérése a két szubsztráton), másrészt a szubsztrát vegetatív növekedésre kifejtett hatása eredményezi. A hím klónok/gametofitonok dominanciája a kidőlt fákön jól értelmezhető erőteljesebb vegetatív növekedésükkel. Továbbá a vizsgálatok fényében magyaráztot tudunk adni arra, hogy hogyan lehetséges a két nem koegzisztenciája. Eredményeink arra utalnak, hogy a hím és női gametofitonok térben ugyan nem, de időben szeparáltak, eltérő szezonális növekedési ritmusuknak köszönhetően. Azaz az eltérő évszakbeli aktivitás időben szeparált niche-eket hoz létre, amelyek lehetővé teszik a térbeli koegzisztenciát és a gyakori sporofitonképzést. Mindez segíti a populáció genetikai variabilitásának fenntartását. Végül a szex-specifikus növekedésbeli eltérések rámutatnak arra, hogy a szexuális dimorfizmus nem feltétlenül átlagos sajátságokban jelentkező különbségként jelenik meg, hanem a nemekre jellemző reakciónormaként.

Az eredmények igen jelentős következménnyel bírnak erdei társulásaink mohafajainak konzervációbiológiájában is. Ismerve, hogy a mohafaj két neme jelentősen eltérő szubsztrátpreferenciával bír, egy erőteljes erdészeti művelés alatt álló állományban (alacsony holtfa arány, ritkásan álló fák) kevert nemű gyepek kialakulására kicsi az esély. Mivel mohák esetében a megtermékenyítés a két nem közvetlen közelségét igényli, egy ilyen populációban ivaros szaporodás csak nagyon ritkán mehet végbe. Ez a populáció genetikai variabilitásának és ez által túlélési esélyeinek drasztikus csökkenéséhez vezethet.

### **3. alprojekt - Feltételezett dormancia és a diasporabank 'genetikai memória' hipotézisének vizsgálata molekuláris markerek segítségével**

#### **Bevezetés**

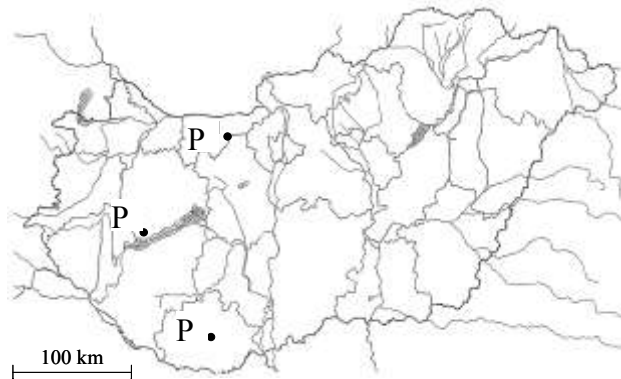
Az alprojekt modelleként szolgáló mohafaj a projektet előkészítő vizsgálatok során módosításra került, így a 2006. évi OTKA beszámolóban foglaltaknak megfelelően az eredetileg kiválasztott *Phascum cuspidatum* lombosmohafaj helyett elindult az élőhelyében és életmenetében igen hasonló alternatív modellfaj, a *Mannia fragrans* alkalmazásának analízise is, amely az elővizsgálatok lezárultával a további kísérletek

modellfajává vált. Erre azért volt szükség, mivel a korábban kijelölt *Phascum cuspidatum*, apró termete miatt csak igen kis mennyiségű DNS kinyerésére adott lehetőséget ( $<0,5$  ng/μl), ami a PCR reakciót követően – a reakciókörülmények körütekintő optimalizálása ellenére is – az alkalmazható technikai kereteken és megoldásokon belül értékelési, megismétlési nehézségeket okozott. Az új modellfaj esetében is megtörtént a reakciókörülmények optimalizálása (alkalmazott DNS mennyisége, magnéziumklorid-koncentráció és anneálási hőmérséklet beállítása) a primerek tesztelése és a leginformatívabb ISSR primerek kiválasztása. Az új modellfaj alkalmazásának következtében a mintavételi területek számát is bővítettük: a vizsgált területek egy, a Misina-Tubes területén fekvő élőhellyel bővültek.

### Mintavétel, módszerek

Mintavételre három helyszínen került sor a modellfaj három jól elkülönült populációjában. Az 1. populáció, amely kisméretű és feltehetően zömében aszexuális úton szaporodik, a Vértesben található, dolomit alapkőzeten kialakult nyílt sziklagyepben (N 47°31'21", E 18°29'57"). 1000 m-es távolságon belül, a szomszédos lejtőkön több kisebb-nagyobb populáció is megtalálható, ezeket a mintaterülettől bokorerdő foltok választják el. A 2. populáció a Mecsekben, meszes alapkőzeten található (N 46°06'09", E 18°12'27"), valamivel nagyobb méretű. A 3. populáció a Szent György-hegy (N 46°49'39", E 17°29'55") meredek délnyugati lejtőjén, bazalt alapkőzeten kialakult gyepten él. E két utóbbi populáció gyakran és tömegesen szaporodik ivarosán, az elsőnél mindkettő jóval izoláltabb.

A mintavételre három alkalommal, a fő vegetációs periódusokban került sor: (1) november, spóratermelés előtt, (2) április (közvetlenül a spórák kiszórását követően), (3) november. A 3. populációban csak az utóbbi alkalommal történt mintavétel.



A mintavétel során minden telepfoltot megjelöltünk, fényképen és térképen rögzítettünk a mintavétel megismételhetőségének érdekében. Minden telepfoltból 5 növényt emeltünk ki vizsgálati célra (amennyiben a folt mérete ezt lehetővé tette). A mintavétellel egy időben a következő paramétereket jegyeztük fel:

foltonkénti telepszám, ivararány.

A talajmintákat az ELTE Növényrendszertani Tanszékének üvegházában inkubáltuk, majd a következőkben leírtaknak megfelelően készítettük elő. A begyűjtött egyedeket binokuláris mikroszkóp alatt a szennyeződésektől megtisztítottuk és a DNS analízist zavaró esetleges gombafertőzések (pl. teleplakó gombák) elkerülése érdekében eltávolítottuk a rizoidokat és a hasi pikkelyeket is. A vizsgálathoz csak a friss apikális hajtásvégeket használtuk föl. A kézi tisztítást egy mágneses keverővel végzett desztillált vizes mosás egészítette ki (5-10 perc).

A faj reprodukív biológiájának és ennek, a populációgenetikai struktúrára gyakorolt hatásának vizsgálatához összesen 1350 egyed nemét minden begyűjtött egyed nemét és klonális tulajdonságait (elágazásszám, oldalhajtásszám, csúshajtásszám) is



feljegyeztük. A genetikailag eltérő egyedek közötti kereszteződés modellezésére 17 archegoniofór sporofitonjának és a hozzájuk tartozó 14 anyanövény genetikai vizsgálatára is sor került.

A DNS kinyeréséhez a Quiagen Dneasy Plant Mini Kit-et használtuk, a gyártó utasítása utolsó lépésének módosításával, hogy a rendelkezésre álló kevés növényi anyagból is optimális mennyiségű DNS-t nyerhessünk (ld. Hock és mtsai. 2008a). A további analízist az előzetes vizsgálatok alapján kiválasztott három ISSR markerrel végeztük el (a tesztelték közül ezen primerek adtak csak kielégítő eredményt és értékelhető polimorfizmust). A PCR reakció körülményeit ld. Hock és mtsai. 2008a. A reakció eredményeit agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá (1.4%) és a kapott csíkokat kézzel értékeltük ki.

Mivel az 1. populáció első mintavételből és a 2. populáció második mintavételből származó talajmintáinak jelentős hányada gombafertőzést szenvedett, ezeket az adatelemzés során nem vettük figyelembe.

Az alkalmazott statisztikai eljárások részletes leírását ld. Hock és mtsai. 2008a, Hock és mtsai. 2008b.

## **Eredmények**

### ***A Mannia fragrans* példája alapján rendelkezhetnek-e a virágos növényekhez hasonlóan a mohák is „genetikai memória” szerepű diasporabankkal?**

A vizsgálatok eredményeképpen első lépésben megválaszolásra került a pályázat céljaként kitűzött kérdés, amely azt kívánta feltárni, hogy vajon a virágos növényekéhez hasonlóan a mohák diasporabankja is képes-e a genetikai variabilitás hosszabb távú megőrzésére, azaz működhet-e egyfajta „genetikai memóriaként”. Eredményeink alátámasztják a „genetikai memória” funkció meglétét a mohák esetében is: a hipotézisnek megfelelően a felszín és a talaj genetikai diverzitása hasonlóan adódott, továbbá az utóbbi több haplotípust illetve talajspecifikus haplotípus-vonalakat is tartalmazott. Ez a tény számos fontos, a felszíni populációk genetikai összetételét és evolúcióképességét meghatározó illetve természetvédelmi vonzattal bír. Ugyan vizsgálatunk az első e téren, mégis a mohák életmenet-stratégiáinak figyelembevételével előrevetíthető, hogy a „genetikai memória” jelensége számos fajnál előfordul: különösen várható ez az időszakosan kedvezővé váló élőhelyek kitartó propagulumokkal, kiterjedt diasporabankkal és genetikailag polimorf populációkkal rendelkező fajainak esetében.

### ***Hogyan befolyásolja a Mannia fragrans reprodukzív ökológiája a populációk genetikai összetételét? Mi a fontosabb: aszexuális vagy szexuális szaporodás?***

A populációgenetikai vizsgálatokat kiegészítve a modellfaj reprodukzív ökológiája is feltárásra került. A genetikai és a reprodukzív biológiai adatok összevetése értékes információt szolgáltatott a mindaddig kevésbé vizsgált polyoikus szaporodási rendszer működéséről valamint egyes elemeinek relatív fontosságáról a populációk genetikai struktúrájának kialakításában.

A növényi populációk genetikai struktúrájának kialakításában meghatározó szerepet játszanak a szaporodást és a terjedést befolyásoló ökológiai tényezők. A polyoikus szaporodási rendszer, amelynél a populációk hím, női és biszexuális egyedeket egyaránt tartalmaznak, nem ritka a mohák körében, azonban működéséről és

populációgenetikai vonzatairól semmit sem tudunk. Az illatos májmoha (*Mannia fragrans*), mint modellfaj segítségével megvizsgáltuk a polyoikus szaporodási rendszer egyes elemeinek relatív fontosságát/hatékonyágát, valamint ezek szerepét a populációk genetikai összetételének kialakításában.

Magas, a telepfoltok méretével növekvő szex-expressziós rátát valamint erőteljesen a nők irányába fordult ivararányokat tapasztaltunk. A reproduktív szervek kifejlődése után a hímek a női egyedeknél több energiát fektettek klonális növekedésbe. A hímnős és steril egyedek hasonló klonális tulajdonságai és mikrohabitat-preferenciája (frissen kolonizált gap-ek) arra utal, hogy a szelekció azokat az újonnan megtelepedő egyedeket részesíti előnyben, amelyek először mindkét nem ivarszerveit kifejlesztik, ezáltal biztosítva az ivaros szaporodást még partner hiányában is.

A gyakori spóratermelés ellenére az alkalmazott ISSR markerek csak kismértékű genetikai diverzitást tártak föl, amely feltehetően a hatékony klonális terjedés és az genetikailag azonos növények között történő megtermékenyítés gyakoriságának eredménye. Mindazonáltal a populációkban előfordul rekombináció és mutáció is, erre utal a ritka allélek és rekombináns haplotípusok jelenléte. Az így keletkezett új haplotípusoknak azonban csak kevés esélyük van a hatékony elterjedésre, mivel a nagyméretű spórák zöme az eredeti telepfoltba kerül vissza, ahol a telepek denzitása miatt a kihajtás esélye alacsony. Mivel a faj populációi izoláltak és méretük relatíve kicsi, ezeket a haplotípusokat a genetikai sodródás folyamatosan eltávolítja, bár némelyikük a propagulumbank segítségével hosszabb időn keresztül is túlélhet, aminek jelentős szerepe lehet az elvesztett genetikai diverzitás pótlásában egy lokális katasztrófát követően.

A „genetikai memória” hipotézis tesztelése a virágos növények esetében az elmúlt években egyre inkább az érdeklődés tárgyává vált, azonban a haploid organizmusok – így a mohák esetében mindaddig nem álltak rendelkezésünkre ismeretek e téren, ezért a jelen kutatások úttörő jellegűnek tekinthetők és további fontos, a jövőben tesztelést igénylő kérdést vetnek fel. Így kérdés lehet, hogy mennyire általánosíthatók az itt kapott eredmények és milyen biológiai tulajdonságok prediktálhatják egy hasonló szerepű diaspórabank meglétét más mohafajoknál. A jövőbeli kutatások várhatóan a nagy spórával rendelkező, genetikailag diverz, időszakos élőhelyekhez alkalmazkodott fajoknál kecsegtetnek eredménnyel. A kitartó propagulumok nagyobb méretéből eredően a diaspórabank genetikai diverzitás megőrzésében betöltött szerepe különösen a lokális dinamikában, finom léptékben lehet jelentős.

A vizsgálatok eredményei hazai és nemzetközi fórumokon is bemutatásra, illetve nemzetközi referált szakfolyóiratokban is publikálásra kerültek (Hock Zsófia doktori disszertáció Zürichi Egyetem, *American Journal of Botany*, *Journal of Bryology*, *Plant Ecology*).

Hock, Zs., Szövényi P, Schneller, JJ, Tóth, Z, Urmi, E. 2008a. Bryophyte diaspore bank: a genetic memory? Genetic structure and genetic diversity of surface populations in the liverwort *Mannia fragrans* (Ayttoniaceae). *American Journal of Botany* 95(5): 542–548.

Hock, Zs, Szövényi, P, Schneller, JJ, Urmi, E, Tóth, Z. 2008b. Population genetic consequences of the reproductive system in the liverwort *Mannia fragrans*. *Plant Ecology* (DOI 10.1007/s11258-008-9541-8).